

MAŁGORZATA GRUDKOWSKA¹**BARBARA ZAGDAŃSKA**^{1,2}¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie² Zakład Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Roślinne endoproteinyazy cysteinowe i ich różnorodne funkcje fizjologiczne

Plant cysteine endoproteases and their multiple physiological roles

Endoproteinyazy cysteinowe wydają się być najważniejszym typem endoproteinaz odpowiedzialnych za inicjację i intensywną hydrolizę białek zapasowych nasion towarzyszącą kiełkowaniu i wczesnej fazie wzrostu i rozwoju siewek. Enzymy te zaangażowane są również w procesy starzenia się organów i różnicowania elementów przewodzących. W odpowiedzi na niekorzystne czynniki abiotyczne tzn. niską lub wysoką temperaturę, deficyt wody czy zasolenie, a także czynniki biotyczne wykazano zwiększoną ekspresję genów kodujących endoproteinyazy cysteinowe. Przypuszcza się, że funkcja tych enzymów nie ogranicza się do eliminacji białek zdenaturowanych, toksycznych w przypadku infekcji patogena czy ataku owadów, a także białek nieprawidłowych powstałych wskutek błędów indukowanych stresem czy też degradacji białek zbędnych tzn. takich, które w określonej sytuacji przestają odgrywać rolę. Funkcja tych enzymów może polegać także na aktywacji specyficznych białek indukowanych stresem niezależnie od jego charakteru. Na przykładzie 55 odmian i rodów pszenicy ozimej i dziesięciu odmianach pszenicy jarej wykazano, że stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności pszenicy jarej i ozimej na deficyt wody i poziom tolerancji mrozowej pszenicy ozimej.

Słowa kluczowe: endoproteinyazy cysteinowe, hydroliza białek, mrozooporność, odporność na suszę, odporność na stresy abiotyczne

Cysteine endoproteases are recognised as the major enzymes responsible for the initiation and subsequent massive hydrolysis of seed storage proteins during germination and early seedling growth and development. These enzymes are also involved in such important processes as organ senescence and xylogenesis. In response to unfavourable environmental conditions like low and high temperature, water deficit and salinity as well as to biotic stresses, the up-regulation of expression of genes encoding cysteine endoproteases has been shown. Their supposed physiological function is not restricted to removal of denatured proteins, toxic in cases of pathogen infection or insect attack, abnormal proteins resulting from the stress-induced changes and to degradation of proteins no longer required by a cell in a new metabolic state. Another important function of these enzymes may be linked to activation of stress-induced non-specific proteins. On the basis of experiments carried out on 55 cultivars and strains of winter wheat and on ten cultivars of spring wheat it has been shown that the induction of cysteine endoproteases was significantly correlated with the level of drought tolerance of spring and winter wheat as well as with the level of frost tolerance of winter wheat.

Key words: cysteine endoproteinases, protein hydrolysis, frost resistance, drought resistance, biotic stress resistance

WSTĘP

Proteinazy cysteinowe są stale powiększającą się grupą enzymów katalizujących reakcje hydrolizy wiązań peptydowych. Enzymy te powszechnie występują w świecie roślin, zwierząt, grzybów i bakterii. Nazewnictwo proteinaz cysteinowych z jednej strony opiera się na budowie centrum aktywnego, a z drugiej na miejscu hydrolizy łańcucha białkowego. Endoproteinazy zawierają resztę cysteiny w centrum aktywnym, a ich inhibitorami diagnostycznymi są jodooctan, jodoacetamid i E64 (Callis, 1995). Proteinazy cysteinowe mogą hydrolizować wiązania zarówno wewnątrz łańcucha białkowego, a tym samym należą do endoproteinaz (EC 3.4.22), jak i mogą hydrolizować wiązania peptydowe sąsiadujące z końcową grupą karboksylową łańcucha polipeptydowego, stąd klasyfikowane są jako karboksypeptydazy (EC 3.4.16 do 3.4.18), a także hydrolizują wiązania peptydowe sąsiadujące z końcową grupą aminową łańcucha białkowego pełnią więc rolę aminopeptydaz (EC 3.4.11).

Rawlings i Barrett (1993) zaproponowali rozszerzenie klasyfikacji endoproteinaz dzieląc endoproteinazy na typy i rodziny. Typ charakteryzuje enzymy w oparciu o centrum odpowiedzialne za katalizę np. typ cysteinowy, aspartylowy, metalojonowy itp. Natomiast rodzina obejmuje grupę enzymów w której każdy przedstawiciel wykazuje ewolucyjne podobieństwo oparte o sekwencje aminokwasowe całego białka i sekwencje odpowiedzialne za aktywność katalityczną. Klasyfikacja ta jest używana coraz powszechniej. Zgodnie z nią wyróżniono czternaście rodzin enzymów cysteinowych, w tym tylko dwie: papainowa i legumainowa występują u roślin wyższych.

W świetle najnowszych badań wydaje się, że endoproteinazy cysteinowe są najważniejszym typem endoproteinaz odpowiedzialnych za inicjację i późniejszą intensywną hydrolizę białek zapasowych nasion towarzyszącą kiełkowaniu i wczesnej fazie wzrostu i rozwoju siewek (Shevery i in., 1995; Schlereth i in., 2000, 2001; Shutov i Vaintraub, 1987). Ponadto enzymy te zaangażowane są w procesy ksylogenezy, reprodukcji oraz starzenia się organów (Cercos i in., 1993; Funk i in., 2002; Wagstagg i in., 2002). Ich udział zaobserwowano również w odpowiedzi roślin na działanie różnych stresów środowiskowych zarówno biotycznych, jak i abiotycznych (Guerrero i in., 1990; Mittler i in., 1997; del Pozo i Lam, 1998). Udział enzymów cysteinowych w tak różnych procesach wskazuje na rolę regulacyjną tych enzymów w degradacji białek roślinnych.

FUNKCJE ROŚLINNYCH ENDOPROTEINAZ CYSTEINOWYCH

Hydroliza białek zapasowych nasienia

Białka zapasowe są zdeponowane w klasycznych tkankach zapasowych, takich jak komórki mezofilu liścienia u dwuliściennych, bielmo ziarniaków zbóż i osie zarodkowe nasion.

Głównymi białkami zapasowymi ziarniaków zbóż są gromadzone w bielmie prolaminy, których nazwa pochodzi od wysokiej zawartości proliny i glutaminy (Shewry in., 1995).

Tabela 1

Roślinne endoproteinazy cysteinowe: symbole enzymów, genów, nazwa rośliny (w której zostały wykryte) i lokalizacja enzymu
Cysteine endoproteinases of plants: designations of enzymes, genes, plants of detection and locations within a plant

Nazwa proteinazy Proteinase	Symbol genu Gene	Nazwa rośliny Plant	Miejsce lokalizacji Location
REP-1	OsEP3A	<i>Oryza sativa</i>	organy wegetatywne vegetative organs
EP-A	Z97023	<i>Hordeum vulgare</i>	bielmo nasion endosperm
EP-B		<i>Hordeum vulgare</i>	bielmo endosperm
CPR1	X75749	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
CPR2	Z30338	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
Proteinaza A Proteinase A	Z34859	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
Cpr4	Z99172	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
Vspb2	AJ007743	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
Proteinaza B Proteinase B	Z34899	<i>Vicia sativa</i>	bielmo endosperm
G1		<i>Glycine max</i>	bielmo endosperm
C1		<i>Glycine max</i>	bielmo endosperm
Oryzainy Orysains		<i>Oryza sativa</i>	bielmo endosperm
Cys P	<i>rd21a</i>	<i>Arabidopsis</i>	epiderma epidermis
Cys P	<i>rd10a</i>	<i>Arabidopsis</i>	epiderma epidermis
Cys P	TPE4A	<i>Pisum sativum</i>	organy generatywne vegetative organs
Ep-c1	X56753	<i>Phaseolus</i>	załącznia ovary
Cys-EP	AF050756	<i>Vinga mungo</i> , <i>Vicia sativa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	organy generatywne generative organs rycynosomy ricinosomes
33 kdacp	<i>mir1</i>	<i>Zea mays</i>	młode liście young leaves
Pscyp15a		<i>Pisum sativum</i>	ściana komórkowa cell wall
Xcp1		<i>Arabidopsis</i>	ksylem xylem
Xcp2		<i>Arabidopsis</i>	ksylem xylem
Sag12		<i>Arabidopsis</i>	liście leaves

Są nimi: hordeiny jęczmienia, zeiny kukurydzy, gliadyny pszenicy, aweniny owsa i sekaliny żyta. Proteoliza tych białek podczas kiełkowania jest początkowo wynikiem aktywności endoproteinaz, a powstające oligopeptydy są substratami dla egzopeptydaz, które odcinają aminokwasy od końca aminowego (N) lub karboksylowego (C). Enzymy proteolityczne odpowiedzialne za hydrolizę białek zapasowych są albo syntetyzowane podczas rozwoju ziarniaka i przechowywane w bielmie lub są syntetyzowane i wydzielane z warstwy aleuronowej i tarczki zarodkowej podczas kiełkowania (Simpson, 2001). Badania przeprowadzone na czterodniowych siewkach jęczmienia wykazały, że w uruchamianie białek zapasowych zaangażowanych jest 27 endoproteinaz cysteinowych spośród czterdziestu dwóch endoproteinaz związanych z kiełkowaniem (Zhang i Jones, 1995). Endoproteinazy cysteinowe są też najważniejszą grupą endoproteinaz w kiełkujących ziarniakach kukurydzy (de Barros i in., 1994) i pszenicy (Bottari i in., 1996), a ich aktywność stanowi około 90% całkowitej aktywności proteolitycznej.

Podczas kiełkowania ziarna zbóż, mobilizacja rezerw zdeponowanych w wakuolach zapasowych (PSV, protein storage vacuoles) następuje w trzech etapach (Enari i Sopanen, 1986). W pierwszej fazie białka zapasowe zdeponowane w warstwie aleuronowej są degradowane do aminokwasów. W drugiej fazie wolne aminokwasy wykorzystywane są do syntezy *de novo* hydrolaz wydzielanych z warstwy aleuronowej lub tarczki zarodkowej do bielma (Bethke i in., 1996). W trzecim etapie hydrolazy te trawią białka zapasowe bielma wytwarzając produkty dostępne dla tarczki zarodkowej. We wczesnym etapie kiełkowania, zarodek syntetyzuje gibereliny, które przemieszczają się do warstwy aleuronowej i są sygnałem alarmowym do syntezy wielu enzymów hydrolitycznych w tym endoproteinaz (Diaz i in., 1993).

Podczas kiełkowania nasion roślin dwuliściennych takich jak *Vigna mungo*, *Vicia sativa*, *Phaseolus vulgaris*, których białkami zapasowymi są głównie globuliny, uruchamianie rezerw ograniczone jest początkowo do osi zarodkowej i odpowiedzialne za te procesy są endoproteinazy cysteinowe zmagazynowane podczas formowania nasion i przechowywane w osiach zarodkowych (Müntz 1996; Schlereth i in., 2000, Schlereth i in., 2001). Późniejsza, intensywna hydroliza białek zachodzi po zsyntetyzowaniu *de novo* innych enzymów proteolitycznych, wśród których główną rolę odgrywają podobnie jak u roślin jednoliściennych endoproteinazy cysteinowe. Jak dotąd nie ma dowodów na to, aby uruchamianie rezerw nasiennych roślin dwuliściennych było pod kontrolą hormonalną zarodka, chociaż taka możliwość była sugerowana (Bewley, 1994).

Badania nad uruchamianiem rezerw nasiennych pozwoliły scharakteryzować i opisać wiele endoproteinaz cysteinowych, których naturalnymi substratami są białka zapasowe nasion. Według Shutova i Vaintrauba (1987) mobilizacja rezerw nasiennych roślin dwuliściennych jest inicjowana przez proteinazy papainowe typu CPRs, a następnie kontynuowana przez enzymy z rodziny legumainowej przy współudziale karboksypeptydaz. Pierwszoplanową rolę endoproteinaz zarówno z rodziny papainowej, jak i legumainowej potwierdzili Fischer i wsp. 2000, Schlereth i wsp. 2001 oraz Tiedeman i wsp. 2001 w mobilizacji rezerw nasiennych roślin dwuliściennych — globulin występujących w nasionach grochu (*Pisum sativum*), soi [*Glycine max* (L) Merr] i fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) w różnych etapach kiełkowania i wzrostu siewki. U roślin

motylkowych, najwcześniej stają się aktywne endoproteiny cysteinowe CPR1 i CPR2 syntetyzowane w osiach zarodkowych oraz w trakcie rozwoju liścienia. Ich obecność stwierdzono również w merystemach korzeni, w komórkach epidermalnych i prokambialnych (Tiedemann i in., 2001). Proteiny A i CPR4 występują dopiero po rozpoczęciu degradacji globulin przez inne proteiny (Fischer i in., 2000). Glicyniany i β -konglicyniany, białka zapasowe soi, degradowane są odpowiednio przez endoproteiny cysteinowe G1 i C1 (Diaz i in., 1993).

W hydrolizie hordein, białek zapasowych jęczmienia, uczestniczą co najmniej trzy endoproteiny cysteinowe: endoproteina EP-B (masa cząsteczkowa 30 kDa), EP-A (masa cząsteczkowa 37 kDa) oraz endoproteina o masie 31 kDa (Phillips i Wallace, 1989; Holwerda i Rogers, 1992; Zhang i Jones, 1996; Ho i in., 2000). Pierwsze dwadzieścia dwa aminokwasy N-domeny endoproteiny EP-B są, aż w dziewięćdziesięciu procentach homologiczne z sekwencją aminokwasową endoproteiny EP-A (Koehler i Ho, 1990). Przypuszcza się, że enzymy te mogą uczestniczyć w modyfikacji innych enzymów hydrolitycznych np. β -amylazy, przyczyniając się tym samym do rozluźniania wiązań wewnątrz enzymu, co prowadzi do zwiększenia jego aktywności (Koehler i Ho, 1990). Gluteiny ryżu degradowane są przez endoproteinę cysteinową REP-1, której sekwencja aminokwasowa jest w 75% homologiczna z sekwencją aminokwasową endoproteiny cysteinowej EP-B jęczmienia. W kielkujących nasionach ryżu wyodrębniono dodatkowo cztery inne endoproteiny cysteinowe (oryzainy α, β, γ oraz pRP80), ale ich naturalne substraty nie są znane (Ho i in., 2000).

Różnicowanie elementów naczyniowych

Proces różnicowania elementów ksylemu związany jest z degradacją zawartości komórki oraz lignifikacją i grubieniem ścian komórkowych. Autoliza komórki prowadzi do zmiany jej funkcji z typowo zapasowej do przewodzącej wodę i sole mineralne. Podczas ksylogenezy zaobserwowano zwiększoną znamienne aktywność ekspresji genów i mRNA kodującego endoproteinę cysteinową syntetyzowaną w wakuolach ksylemu (Ho i in., 2000; Beers i Freeman 1997; Funk i in., 2002).

W różnicowanie elementów naczyń zaangażowane są dwie papainowe endoproteiny XCP1 i XCP2. Syntetyzowane są one jako prepropetydy (forma nieaktywna), a ich aktywacja następuje po odcięciu domen pre i pro. N-domena z sekwencją sygnałową umożliwia translokację tych endoprotein do światła retikulum endoplazmatycznego.

Starzenie organów

Proces starzenia jest końcową fazą rozwoju wielu komórek. Starzenie związane jest z degradacją materiału komórkowego oraz dezintegracją organelli prowadząc do zmian strukturalnych, biochemicznych i molekularnych (Huang i in., 2001). Głównym miejscem degradacji materiału komórkowego: białek, kwasów nukleinowych, oligosacharydów są wakuole w których zgromadzone są liczne enzymy hydrolityczne w tym m.in. endoproteiny cysteinowe głównie z rodziny papainowej (Cercos i in., 1993). Proteoliza białek w procesie starzenia koordynuje degradację makrocząsteczek i remobilizację do rosnących części rośliny, dojrzewających nasion lub organów zapasowych (Wagstaff i in., 2002). Starzenie liści regulowane jest czynnikami środowiskowymi (m.in. ekstremalną

temperaturą, suszą, brakiem składników pokarmowych, infekcją patogena) lub podlega kontroli genetycznej (m.in. wiek i poziom hormonów). Również procesy rozwojowe np. dojrzewanie owoców i nasion przyczyniają się do przyspieszenia procesu starzenia liści. Molekularny mechanizm starzenia nie został dobrze poznany, przypuszcza się, że jest związany z indukcją ekspresji specyficznych genów i produkcją specyficznych białek. Wyodrębniono kilka klas genów SAGs (senescence-associated-genes) kodujących enzymy degradacyjne w tym endoproteinazy cysteinowe m.in SAG 12 w liściach *Arabidopsis* (Cercos i in., 1993; Wagstaff i in., 2002).

Udział endoproteinaz w odpowiedzi na stresy biotyczne

Analogicznie do komórek zwierzęcych, komórki roślinne mogą inicjować programowaną śmierć komórki (PCD) w wyniku infekcji przez patogena, wirusy oraz wydzielania toksyn przez grzyby (Mlejnek i Prochazka, 2002). Wyróżniamy dwa typy odpowiedzi roślin na atak patogena. U roślin odpornych istnieje pierwszy rodzaj reakcji określany jako nadwrażliwy (HR, hypersensitive response) i jest związany z gwałtowną śmiercią komórki w pierwotnym miejscu infekcji. U roślin wrażliwych występuje drugi typ odpowiedzi w którym komórki wolniej zamierają, a infekcja postępuje stopniowo. Apoptozie towarzyszy zwiększona przepuszczalność błon, kondensacja jądra komórkowego oraz wpływ jonów wapnia (Lam i del Pozo, 2000). Obecnie posiadamy mało informacji o programowanej śmierci komórki u roślin w odróżnieniu od dobrze poznanych i opisanych procesów występujących w komórkach zwierzęcych. U zwierząt sygnalizacja prowadzi do aktywacji kaspaz, enzymów z rodziny endoproteinaz cysteinowych hydrolizujących wiązania z resztami asparaginowymi. Czynniki wpływające na śmierć komórki stymulują uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu i wiązanie z białkiem Apaf1 (apoptotic protease activating factor). W wyniku tego procesu uwalniania jest energia w postaci ATP/dATP, która aktywuje kolejną kaspazę-9 (Mlejnek i Prochazka, 2002).

Powstaje więc pytanie, czy analogiczne roślinne endoproteinazy podobne do kaspaz (CLPs) pełnią zbliżoną funkcję do endoproteinaz cysteinowych występujących w komórkach zwierzęcych. Dane dotyczące występowania CLPs w roślinach są stale pośrednie i głównie oparte na efekcie specyficznych inhibitorów. Po raz pierwszy efekt zastosowania specyficznych inhibitorów kaspaz u tytoniu został opisany przez del Pozo i Lam (1998). Zastosowany inhibitor Ac-DEVD-CHO (specyficzny dla kaspazy-3) oraz Ac-YVAD-CMK (specyficzny dla kaspazy-1) wyizolowany z *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (patogen fasoli) spowodował zniesienie nadwrażliwej reakcji (HR) w komórkach tytoniu. W ostatnich badaniach wykazano, że mechanizm regulujący PCD w komórkach roślinnych i zwierzęcych jest bardzo zbliżony: Zhao i wsp. (1999) udowodnili, że cytochrom c, pochodzący od zwierząt jest w stanie aktywować endoproteinazy roślinne podobne do kaspaz. W aktywacji roślinnych endoproteinaz podobnych do kaspaz bierze udział izopentydyloadenozyna (iPA) (Mlejnek i Prochazka, 2002).

W odpowiedzi na atak owadów z rodzaju *Lepidoptera* odporne genotypy kukurydzy syntetyzują unikalną endoproteinazę cysteinową o masie 33 kDa, kodowaną przez *mir1*, w której C domenę stanowi 25 aminokwasów o nieznanej sekwencji odpowiadającej sekwencji kodowanej przez geny *mir2* i *mir3* (Pechan i in., 2002). Badania udowodniły, że larwy karmione genotypami kukurydzy odpornej hamują wzrost owada o ok. 50%.

Mechanizm hamowania wzrostu larw prawdopodobnie jest związany z katalizą toksycznych cząstek substratu obecnego zarówno w owadach jak i roślinach. Przypuszcza się również, że ta endoproteinaza degradowe błonę owada i zwiększa podatność larw na wirusy. Synteza owej specyficznej endoproteinazy cysteinowej 33 kDa zachodzi w rozwijających się liściach. Prawdopodobnie endoproteinaza ta może stanowić także mechanizm obronny roślin w odpowiedzi na atak owadów (Pechan i in., 2000).

Udział endoproteinaz w odpowiedzi na stresy abiotyczne

Programowana śmierć komórki może towarzyszyć również procesom wywołanym przez stresy środowiskowe m.in. niską temperaturę, zasolenie, czy suszę prowadzące do stresu oksydacyjnego (Solomon i in., 1999). Doświadczenia przeprowadzone na komórkach soi, poddanych stresowi oksydacyjnemu indukującemu apoptozę wykazały, że programowanej śmierci komórki towarzyszy wzrost aktywności endoproteinaz cysteinowych i możliwe zmiany aktywności genów kodujących inhibitory proteinaz (Solomon i in., 1999). Autorzy sugerują, że rośliny posiadają zdolność kontrolowania apoptozy poprzez modyfikację aktywności endoproteinaz cysteinowych.

Dehydratacja komórki, spowodowana zarówno działaniem zbyt wysokiej lub zbyt niskiej temperatury na roślinę, suszą glebową lub atmosferyczną, a także w wyniku zasolenia zazwyczaj prowadzi do zmian w natywnej konformacji białek lub utraty ich aktywności. Dlatego zdolność rośliny do tolerowania odwodnienia musi być związana z efektywnymi mechanizmami reperującymi uszkodzone białka, usuwającymi zdenaturowane białka i w ten sposób zapobiegającymi powstawaniu uszkodzeń metabolicznych oraz usuwającymi białka zbędne tzn. takie, które w określonej sytuacji metabolicznej przestają odgrywać swoją specyficzną rolę (Ingram i Bartels, 1996). Odpowiedzią metaboliczną rośliny na stresy środowiskowe jest indukcja endoproteinaz cysteinowych.

Zarówno niska dodatnia temperatura (chłodowa), jak i wysoka temperatura powoduje zwiększenie ekspresji genu kodującego endoproteinazę cysteinową (C14) w owocach pomidora (Schaffer i Fischer, 1988, 1990). Autorzy sugerują, że enzym ten może degradować białka zdenaturowane przez ekstremalne temperatury.

U grochu zidentyfikowano kilka genów kodujących endoproteinazy cysteinowe m.in. *PsCyp15a*, który jest związany z adaptacją komórek do zmieniającego się turgoru (Guerrero i in., 1990). Ponadto autorzy ci uważają, że endoproteinazy cysteinowe mogą zmieniać metabolizm poprzez przyspieszenie obrotu białek (protein turnover) lub przez aktywację specyficznych białek. W wyniku degradacji białek występujących w wakuoli organów wegetatywnych i zwiększonemu stężeniu aminokwasów zachodzi obniżenie potencjału wody. Dalsze badania wykazały, że zwiększoną ekspresję genu *PsCyp15a* obserwuje się w warunkach zasolenia i suszy, ale nie obserwuje się zwiększenia jego ekspresji w odpowiedzi na zranienie, kwas giberelinowy, chłód i wysoką temperaturę (Jones i Mullet, 1995). Endoproteinazę CYP15a zlokalizowano w ścianach komórkowych, natomiast nie stwierdzono jej w wakuoli, gdzie występuje w formie nieaktywnego proenzymu, którego aktywacja zachodzi pod wpływem obniżającego się pH w wyniku deficytu wody. Autorzy przyznają, że funkcja tego enzymu pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Transkrypt genu *PsCYP15a* został wykryty również w brodawkach korzeniowych grochu (Vincent i Brewin, 2000). Enzym ten w przeciwieństwie do liści

występuje wyłącznie w wakuolach i pęcherzykach cytoplazmatycznych, natomiast nie stwierdzono jego obecności w ścianach komórkowych. Jego funkcja również nie została sprecyzowana. Autorzy wysuwają przypuszczenie, że enzym ten bierze udział w przebudowie białek roślinnych: aminokwasy uzyskane z hydrolizy białek nieużytecznych mogą zostać wykorzystane do syntezy białek indukowanych przez stres np. akwaporyn.

Wzrastający deficyt wody w pędach *Arabidopsis thaliana* powoduje zwiększenie aktywności endoproteinaz cysteinowych (r10A i r21A) kodowanych przez geny *rd* (responsive to desiccation). Mechanizm aktywowania tych genów nie został poznany (Koizumi i in., 1993). Przypuszcza się jednak, że istnieją co najmniej dwa szlaki transdukcji sygnału deficytu wodnego. Pierwszy, zależny od ABA, kiedy w wyniku wzrastającej akumulacji ABA zachodzi zwiększona ekspresja genów oraz drugi, niezależny od ABA, w którym obniżony turgor komórki roślinnej jest prawdopodobnie sygnałem do zwiększenia ekspresji genów *rd*. Podobnie niska temperatura zwiększa ekspresję tych genów u *A. thaliana* (Koizumi i in., 1993). Funkcja endoproteinaz r10A i r21A również nie została poznana. Autorzy przychylają się do sugestii wysuniętej przez Schaffera i Fishera (1988, 1990), że enzymy te mogą degradować białka zdenaturowane przez stres.

W odpowiedzi na deficyt wody aktywność endoproteinaz wakuolarnych w liściach pszenicy zwiększa się siedmiokrotnie (Zagdańska i Wiśniewski, 1996). Dominujący udział (około 50%) endoproteinaz serynowych w całkowitej proteolizie praktycznie nie ulega zmianie, natomiast dwukrotnie zwiększa się udział endoproteinaz cysteinowych przy dwukrotnie zmniejszonym udziale endoproteinaz aspartylowych. Badania przeprowadzone na dziesięciu odmianach pszenicy jarej różniących się zdolnością do tolerowania odwodnienia i do aklimatyzacji wykazały, że wysoka tolerancja odwodnienia pszenicy zarówno w fazie strzelania w źdźbło, jak i kłoszenia wiąże się ze zmniejszoną aktywnością endoproteinaz cysteinowych (Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Z kolei badania przeprowadzone na 55 odmianach i rodach pszenicy ozimej o zróżnicowanej odporności na mróz wykazały wysoką korelację ($r = 0,86$) z odpornością tych pszenic na deficyt wody (Grudkowska in., 2001). Po okresie aklimatyzacji do mrozu, aktywność endoproteinaz cysteinowych odmian odpornych nie ulegała zmianie lub nawet zmniejszała się, a u odmian nieodpornych aktywność tych enzymów zwiększała się. Aktywność endoproteinaz cysteinowych u wszystkich badanych odmian była wysoce negatywnie skorelowana z poziomem mrozoodporności badanego materiału ($r = -0,86$). Przeprowadzone badania jednoznacznie wykazały, że stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności pszenicy jarej i ozimej na deficyt wody i poziom tolerancji mrozowej pszenicy ozimej. Posłużyły one także do opracowania prostego i niezbyt kosztownego testu laboratoryjnego umożliwiającego szybką selekcję materiałów hodowlanych pszenicy odpornych na mróz i suszę (Grudkowska in., 2002).

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, odpowiedzią rośliny zarówno na stresy abiotyczne, jak i biotyczne jest indukcja genów kodujących endoproteinazy cysteinowe. Jednakże ich naturalne substraty i funkcja nie jest dotychczas poznana. Wiadomo, że aktywność proteolityczna roślin może być regulowana przez specyficzne białka inhibitorowe proteinaz, a ich funkcja polega na obronie rośliny przed organizmami

roślinożernymi. Jednakże ostatnie badania wykazały, że białko BnD22 u rzepaku i WSCP u kalafiora indukowane zarówno przez deficyt wody, jak i zasolenie są białkami należącymi do rodziny białek inhibitorowych proteinaz typu Kuniz (Downing i in., 1992, Nishio i Satoh 1997). Może to oznaczać, że aktywność niektórych proteinaz jest hamowana w warunkach stresu, podczas gdy aktywność innych proteinaz jest indukowana. W świetle tych danych nie jest jasne, czy indukcja endoproteinaz cysteinowych, związanych m.in. z programowaną śmiercią komórki może mieć jakiekolwiek znaczenie w aklimatyzacji rośliny do niekorzystnych warunków środowiska. Powstaje więc pytanie, czy zwiększona aktywność tych enzymów może mieć znaczenie w tolerancji odwodnienia poprzez usuwanie skutków stresu czy też jest konsekwencją działania stresów środowiskowych prowadzących do powstania uszkodzeń i tym samym do zainicjowania programowanej śmierci komórki, jak to sugeruje Fukuda (1996). Można też podejrzewać, że genetycznie uwarunkowana odpowiedź rośliny na stresy abiotyczne jest odzwierciedleniem intensywności usuwania zbędnych lub uszkodzonych białek na drodze proteolizy wakuolarniej, a w przypadku silnego lub długotrwałego stresu endoproteinazy cysteinowe indukują programowaną śmierć tych komórek i organów, które nie decydują o przeżyciu rośliny. Poszukiwanie odpowiedzi na te pytania stwarza nowe perspektywy badawcze, mogące znaleźć praktyczne zastosowanie w ukierunkowanej hodowli roślin.

LITERATURA

- Beers E. P., Freeman T. B. 1997. Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia mesophyll* cultures. *Plant Physiol.* 113:873 — 880.
- Beers E. P., Woffenden B. J., Zhao Ch. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 399 — 415.
- Bethke P. C., Swanson S. J., Hillmer S., Jones R. 1998. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Ann. Bot.* 82: 399 — 412.
- Bewley J. D., Black M. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*, 2nd ed. Plenum, New York.
- Bottari A., Cappocchi A., Fontanini D., Galeschi L. 1996. Major proteinase hydrolysing gliadin during wheat germination. *Phytochem.* 43: 39 — 44.
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *Plant Cell* 7: 845 — 857.
- Cercós M., Harris N., Carbonell J. 1993. Immunolocalization of a thiol-protease induced during the senescence of unpollinated pea ovaries. *Physiol. Plant.* 88: 275 — 280.
- deBarros E.G., Larkins B.A. 1994. Cloning of a cDNA encoding a putative cysteine protease gliadin during wheat germination. *Phytochem.* 43: 39 — 44.
- del Pozo O., Lam E. 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* 8: 1129 — 1132.
- Diaz P., Wilson K. A., Tan-Wilson A. L. 1993. Immunocytochemical analysis of proteolysis in germinating soybean. *Phytochem.* 33 (5): 961 — 968.
- Downing W. L., Mauxion F., Fauvarque M. O., de Vienne D., Vartanian N., Giraudat J. 1992. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant J.* 5: 685 — 693.
- Enari T. M., Sopanen T. 1986. Mobilization of endosperm reserves during germination of barley. *J. Inst. Brew.* 92: 25 — 31.
- Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B., Schlereth A., Senyuk V., Shutov A., Muntz K. 2000. The families of papain- and legumain like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intercellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Mol. Biol.* 48:83 — 101.

- Fukuda H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299 — 325.
- Funk V., Kositsup B., Zhao Ch., Beers E. P. 2002. The arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol.* 128: 89 — 94.
- Greenberg J. T. 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12094 — 12097.
- Grudkowska M., Wiśniewski K., Zagdańska B. 2001. Endoproteinyzyny cysteinowe w siewkach pszenicy zaaklimatyzowanych do niskiej temperatury i suszy. *Streszczenia str. 300. XXXVII Zjazd P T Bioch.* Toruń.
- Grudkowska M., Wiśniewski K., Zagdańska B. 2002. Aktywność endoproteinyzyny cysteinowych wskaźnikiem odporności siewek pszenicy ozimej na mróz i suszę. *Biul. IHAR* 223/224: 45 — 55.
- Guerrero C., Calle M., Reid M. S., Valpuesta V. 1998. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Heimerocallis spp.*) during flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 36:565 — 571.
- Guerrero F. D., Jones J. T., Mullet J. E. 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11 — 26.
- Ho S. L., Tong W. F., Yu S. M. 2000. Multiple mode of regulation of cysteine proteinase gene expression in rice. *Plant Physiol.* 122: 57 — 66.
- Holwerda B. C., Rogers J. C. 1992. Purification and characterization of aleurain *Plant Physiol.* 99: 848 — 855.
- Huang Y-J., To K-Y., Yap M-N., Chiang W-J., Suen D-F., Chen S-C.G. 2001. Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol. Plant.* 113: 384 — 391.
- Ingram J., Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377 — 403.
- Ishii S. I. 1994. Legumain: asparaginyln endopeptidase. *Methods Enzymol.* 224: 604 — 615.
- Jabs T., Dietrich R. A., Dangel J. L. 1996. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853 — 1856.
- Jones J. T., Mullet J. E. 1995. A salt and dehydration- inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. *Plant Mol. Biol.* 28: 1055 — 1065.
- Koehler S. M., Ho T. D. 1990. A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digest hordein. *Plant Physiol.* 94: 251 — 258.
- Koizumi M., Yamaguchi- Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought- inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129: 175 — 182.
- Lam E., del Pozo O. 2000. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 417 — 428.
- Mittler R., Simon L., Lam E. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333 — 1344.
- Mlejnek P., Prochazka S. 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopeptidyloadenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158 — 166.
- Müntz K. 1996. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp. Bot.* 47: 605 — 622.
- Nishio N., Satoh H. 1997. A water soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought- induced 22- kilodalton protein in rapeseed. *Plant Physiol.* 115: 841 — 846.
- Pechan T., Ye L., Chang Y., Mitra A., Lin L., Davies F., Williams W., Luthe D. 2000. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other *Lepidoptera*. *Plant Cell* 12: 1031 — 1040.
- Phillips H. A., Wallace W. 1989. A cysteine endopeptidase from barley malt which degrades hordein. *Phytochem.* 28 (12): 3285 — 3290.
- Rawlings N. D., Barret A. J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem.* 299: 205 — 218.
- Schaffer M. A., Fischer R. L. 1988. Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 87: 431 — 436.

- Schaffer M. A., Fischer R. L. 1990 Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 93: 1486 — 1491.
- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 1423 — 1433.
- Schlereth A., Standhardt D., Mock H.P., Müntz K. 2001. Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212: 718 — 727.
- Schmid M., Simpson D., Gietl Ch. 1999. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 14159 — 14164.
- Shewry P. R., Napier J. A., Tatham A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945 — 956.
- Shutov A. D., Vaintraub I. A. 1987. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochem.* 26: 1557 — 1566.
- Simpson D. J. 2001. Proteolytic degradation of cereal prolamins — the problem with proline. *Plant Sci.* 161: 825 — 838.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plant. *Plant Cell* 11: 431 — 443.
- Tiedemann J., Schlereth A., Müntz K. 2001. Differential tissue- specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* 212: 728 — 738.
- Vincent J. L., Brewin N. J. 2000. Immunolocalization of cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiol.* 123: 521 — 530.
- Wagstaff C., Leverenz M. K., Griffith G., Thomas B., Chanasut U., Stead A. D., Roger H. J. 2002. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *J. Exp. Bot.* 53: 233 — 240.
- Wiśniewski K., Zagdańska B. 2001. Genotype- dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52: 1455 — 1463.
- Xu Y., Hanson R. 2000. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol.* 122: 1323 — 1333.
- Zagdańska B., Wiśniewski K. 1996. Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficit. *Acta Biochim. Polon.* 43: 515 — 520.
- Zhang N., Jones B. L. 1996. Purification and partial characterization of a 31-kDa cysteine endopeptidase from germinated barley. *Planta* 199: 565 — 572.
- Zhao C., Johnson B. J., Kositsup B., Beers E. P. 2000. Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiol.* 123: 1185 — 1196.